

Similaridade genética em acessos de *Aegilops tauschii*, *Triticum durum* e híbridos interespecíficos

Sandra Patussi Brammer¹, Ana Lídia Variani Bonato¹, Fernanda Rodrigues Rizotto²

Foto: Sandra Brammer



**Passo Fundo, RS
2008**

Resumo

Estudo genéticos entre diferentes espécies relacionadas evolutivamente, permitem determinar a variabilidade genética e uso posterior para o desenvolvimento de novas cultivares de interesse agrônomo. Neste sentido, as espécies *Aegilops tauschii* e *Triticum durum* se destacam como reservatório de genes importantes para os programas de melhoramento da Embrapa Trigo. O objetivo do presente estudo foi avaliar a similaridade genética existente entre acessos de *Ae. tauschii*, *T. durum* e os híbridos do cruzamento entre as duas espécies. Foram utilizados 14 acessos de *Ae. tauschii*, cinco de *T. durum*, e nove dos híbridos obtidos na Embrapa Trigo. Para a obtenção do DNA genômico total, foram coletadas folhas jovens, sendo que a extração foi feita pelo método CTAB, usado como rotina na Embrapa Trigo. A quantificação foi feita em espectrofotômetro e as amostras diluídas para 50 ng/ul. Os ciclos de PCR foram: 3 minutos a 94°C; 45 vezes de 1 minuto a 94°C; 1 minuto a 60°C (temperaturas de anelamento dos primers 50°C, 55°C ou 60°C) e 2 minutos a 72°C; 10 minutos a 72°C. Estas reações foram migradas em gel de agarose 2% e visualizadas pelo método de coloração com brometo de etídio. A similaridade genética foi determinada pelo coeficiente de Jaccard e os agrupamentos foram realizados por UPGMA através do programa computacional NTSYS-pc. Para os 15 primers polimórficos obtidos, foi observado no dendrograma três grupos distintos, sendo um grupo formado pelos parentais de *Ae. Tauschii*, outro pelos parentais de

¹ Pesquisadora Embrapa Trigo. Rodovia BR 285, km 294, caixa postal 451, CEP 99001-970. Passo Fundo – RS. E-mail: sandra@cnpt.embrapa.br; analidia@cnpt.embrapa.br.

² Bióloga, Universidade de Passo Fundo. Endereço atual: Rua Dom Miguel, 865. Vila Real, CEP 88337-140, Balneário Camboriú – SC. E-mail: ferbiol@yahoo.com.br.

T. durum e o terceiro pelos híbridos. Além disso, detectou-se variabilidade intra-específica em cada grupo, sendo que o coeficiente de maior similaridade foi de 0,92.

Abstract

Genetic studies between related species can be used to determine their genetic variability and their use in the development of new varieties. *Aegilops tauschii* and *Triticum durum* are two important species, used as genetic resources in the wheat breeding program at Embrapa. The objective of the present study was to evaluate the genetic similarity between 14 accesses of *Ae. tauschii*, five of *T. durum* and nine of the resulting hybrids originated from the crossing between the two species. Total genomic DNA was extracted by CTAB method, from young leaves, as protocol used at Embrapa Trigo. DNA was quantified using a spectrophotometer and it was diluted to 50 ng/ul. PCR amplification cycles were performed as follow: 94°C/3 minutes, 45 cycles of 94°C/1 minute, 60°C/1 minute (primers annealing temperatures were 50°C, 55°C or 60°C), 72°C/2 minutes and finally 72°C/10 minutes. The amplification products were separated on 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining method. The genetic similarity was determined using NTSYS-pc software and a dendrogram was generated using UPGMA cluster analysis. The dendrogram derived from UPGMA analysis were based on 15 polymorphic primers and generated three distinct groups: a group formed by *Ae. Tauschii*, another one for *T. durum* and the third for their hybrids. Moreover, intra-specific variability in each group was detected, and the highest similarity coefficient was 0,92.

Introdução

O trigo é uma das espécies mais estudadas mundialmente, tanto sob o ponto de vista científico e tecnológico quanto econômico. Os grandes avanços no desenvolvimento de cultivares de alta produtividade são, em parte, resultados da exploração pelo homem dos traços ancestrais das cultivares. A preservação e a expansão do conjunto gênico, isto é, conservação e ampliação da biodiversidade utilizável para os programas de melhoramento, podem ser analisadas por meio do seu papel no desenvolvimento de uma agricultura auto-sustentável (Brammer, 2002).

O trigo de panificação, *Triticum aestivum* L. é uma espécie alohexaploide ($2n=6X=42$, AABBDD), produto da hibridação entre o trigo tetraploide *T. turgidum* L. ($2n=4X=28$, AABB) e a espécie diplóide *Aegilops tauschii* (= *Ae. squarrosa*, *T. tauschii*, $2n=2X=14$, DD) (Gupta et al., 2008). Estimativas sobre a similaridade/diversidade genética das espécies afins ou de diferentes espécies domesticadas, através de marcadores moleculares, apresentam-se como uma técnica importante aos programas de melhoramento genético (Pestova et al., 2000; Walsh, 2008), bem como pelo uso de tais espécies para aumentar a variabilidade genética, incorporando genes agronomicamente importantes, cruzando estes com seus parentes silvestres. Nesse sentido, o *Aegilops tauschii* e o *Triticum durum* se destacam oferecendo genes de resistência e/ou tolerância a estresses bióticos e abióticos para melhoria genética. O estudo genético destas espécies oferece conhecimento sobre transferência de genes e variabilidade genética para o desenvolvimento de cultivares de interesse agrônomo.

Recursos genéticos são conceituados como materiais genéticos portadores de genes que possuem valor real ou potencial, sendo considerados a base para o

desenvolvimento de variedades e cultivares. Dentro dos recursos genéticos, um dos principais requisitos de valoração é a diversidade genética presente (Bonow, 2007).

Bered (1999) descreve que existem diferentes formas de caracterizar ou conhecer o germoplasma de uma espécie. Destaca que, através da variabilidade existente, o melhorista pode escolher como genitores de um cruzamento, indivíduos distantes geneticamente, o que contribui para a ampliação da variância genética em populações segregantes.

Contudo, a similaridade/diversidade genética, estimada através da avaliação de caracteres morfológicos, apresenta uma série de limitações, uma vez que se tem a influência do ambiente, não é considerada a similaridade genética total entre os indivíduos, além de haver, em muitos casos, erros de estimativas. Como forma de minimizar tais erros, atualmente emprega-se os marcadores de DNA de modo preciso e eficiente nos diferentes acessos dos bancos de germoplasma, principalmente para o uso posterior desses recursos genéticos em programas de melhoramento. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a similaridade genética existente entre acessos de *Ae. tauschii*, *T. durum* e os híbridos do cruzamento entre as duas espécies, por meio de marcadores microssatélites.

Materiais e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia – área de genética molecular - do Núcleo de Biotecnologia Aplicada a Cereais de Inverno da Embrapa Trigo (Passo Fundo – RS). Foram utilizados 14 acessos de *Ae. tauschii*, cinco de *T. durum* e nove de híbridos destes cruzamentos, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo (Tabela 1).

Para a extração do DNA genômico foram coletadas folhas jovens obtidas de sementes germinadas em papel germitest. Extraíu-se o DNA pelo método de CTAB, segundo protocolo descrito por Bonato (2008) e utilizado como rotina no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo, sendo que a quantificação foi feita em espectrofotômetro. As amostras de DNA foram diluídas a 50 ng/ul e mantidas a – 20°C até o momento de uso. Foram testados inicialmente 31 primers de microssatélites (Tabela 2).

Os ciclos de PCR foram: 3 minutos a 94°C; 45 vezes de 1 minuto a 94°C; 1 minuto a 60°C (temperaturas de anelamento dos primers 50°C, 55°C ou 60°C) e 2 minutos a 72°C; 10 minutos a 72°C. Estas reações foram migradas em gel de agarose 2% e visualizadas com brometo de etídio.

Para a análise da similaridade genética, primeiramente foram construídas matrizes de dados, codificando-se a presença (1) ou ausência (0) das bandas visualizadas nos géis. A ausência de amplificação num indivíduo foi considerada como dado perdido (9). A similaridade genética entre os diferentes acessos foi estimada pelo coeficiente de Jaccard (1901), uma vez que esse índice é utilizado para fenótipos não interpretáveis em nível de locos e alelos por ser próprio para dados do tipo presença/ausência (dados binários). Os acessos foram agrupados usando o UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages), desenvolvido por Sokal & Michener (1958) ou método de agrupamento aos pares usando médias não ponderadas, sendo que os acessos foram considerados as unidades taxonômicas operacionais (OTUs) e os caracteres (binários) foram as bandas obtidas por microssatélites. Estas análises foram realizadas com o programa computacional NTSYS-pc - Numerical Taxonomy System of Multivariate Analysis System (Rohlf, 1998).

Tabela 1. Acessos de *Aegilops tauschii*, *Triticum durum* e híbridos obtidos dos cruzamentos entre estes parentais.

<i>Aegilops tauschii</i>	Híbridos	<i>Triticum durum</i>
NE 20190-Z	PF964001	Duilio
NE 20165-A	PF964002	Peleo
NE 20194-Y	PF964003	Latinio
NE 20201-X	PF964004	Ulisses
NE 20201-A	PF964005	Hercules
NE 20195-X	PF964006	
NE 20165-Y	PF964009	
NE 20165-X	PF964010	
NE 20190-X	PF964011	
NE 20195-B		
NE 20194-X		
NE 20201-Y		
NE 20195-C		
NE 20190-A		

Tabela 2. Primers empregados nas análises moleculares por microssatélites e temperatura de anelamento.

Primer	Primer esquerda	Primer direita	Temperatura anelamento
WMS 106	CTG TTC TTG CGT GGC ATT AA	AAT AAG GAC ACA ATT GGG ATG G	60
WMS 455	ATT CGG TTC GCT AGC TAC CA	ACG GAG AGC AAC CTG CC	55
WMS 311	TCA CGT GGA AGA CGC TCC	CTA CGT GCA CCA CCA TTT TG	60
WMS 608	ACA TTG TGT GTG CGG CC	GAT CCC TCT CCG CTA GAA GC	60
WMS 624	TTG ATA TTA AAT CTC TCT ATG TG	AAT TTT ATT TGA GCT ATG CG	50
WMS 205	CGA CCC GGT TCA CTT CAG	AGT CGC CGT TGT ATA GTG CC	60
WMS 55	GCA TCT GGT ACA CTA GCT GCC	TCA TGG ATG CAT CAC ATC CT	60
WMS 325	TTT CTT CTG TCG TTC TCT TCC C	TTT TTA CGC GTC AAC GAC G	60
WMS 295	GTG AAG CAG ACC CAC AAC AC	GAC GGC TGC GAC GTA GAG	60
WMS 437	GAT CAA CAC TTT TGT ATC TCT C	GAT GTC CAA CAG TTA GCT TA	50
WMS 642	ACG GCG AGA AGG TGC TC	CAT GAA AGG CAA GTT CGT CA	60
WMS 232	ATC TCA ACG GCA AGC CG	CTG ATG CAA GCA ATC GAC C	55
WMS 341	TTC AGT GGT AGC GGT CGA G	CCG ACA TCT CAT GGA TCC AC	55
WMS 271	CAA GAT CGT GGA GCC AGC	AGC TGC TAG CTT TTG GGA CA	60
WMC 166	ATA AAG CTG TCT CTT TAG TTC G	GTT TTA ACA CAT ATG CAT ACC T	55
WMC 175	GCT CAG TCA AAC CGC TAC TTC T	CAC TAC TCC AAT CTA TCG CCG T	55
WMC 181	TCC TTG ACC CCT TGC ACT AAC T	ATG GTT GGG AGC ACT AGC TTG G	50
WMC 245	GCT CAG ATC ATC CAC CAA CTT C	AGA TGC TCT GGG AGA GTC CTT A	60
WMC 25	TCT GGC CAG GAT CAA TAT TAC T	TAA GAT ACA TAG ATC CAA CAC C	60
WMC 331	CCT GTT GCA TAC TTG ACC TTT TT	GGA GTT CAA TCT TTC ATC ACC AT	55
WMC 41	TCC CTC TTC CAA GCG CGG ATA G	GGA GGA AGA TCT CCC GGA GCA G	55
WMC 43	TAG CTC AAC CAC CAC CCT ACT G	ACT TCA ACA TCC AAA CTG ACC G	55
WMC 48	GAG GGT TTC TGA ATG TTT TGC C	ACG TGC AGG GAG GTA TCT TTG C	55
WMC 52	TCC AAT CAA TCA GGG AGG AGT A	GAA CGC ATC AAG GCA TGA AGT A	55
WMC 167	AGT GGT AAT GAG GTG AAA GAA G	TCG GTC GTA TAT GCA TGT AAA G	55
WMS 102	TCT CCC ATC CAA CGC CTC	TGT TGG TGG CTT GAC TAT TG	55
WMS 349	ATC GGT GCG TAC CAT CCT AC	GGC TTC CAG AAA ACA ACA GG	55
GDM 62	GAA AGC CGT CCA CTG CC	GAT CTT GAA GCA CTC TTG GT	55
GDM 107	AGCAACAAACGCGAGAGC	TGACACCCGGTTGTTGG	55
GDM 8	TTCTCCAACGCACGTTAGC	CCCAAATGATGGCAGCTACT	55
GDM 93	AAAAGCTGCTGGAGCATACA	GGAGCATGGCTACATCCTTC	55

Resultados e discussão

Dos 31 primers microssatélites testados, apenas 15 foram polimórficos. A Fig. 1 apresenta o dendrograma gerado, destacando-se três grupos distintos: um grupo formado pelos parentais de *Ae. tauschii*; outro pelos parentais de *T. durum* e o terceiro pelos híbridos. Considerando-se os acessos individualmente, pode-se detectar variabilidade intra-específica em cada grupo, sendo que o coeficiente de maior similaridade foi de 0,92.

A partir dos resultados obtidos, ficou evidente a eficiência do método empregado, bem como da escolha do marcador, pois os agrupamentos obtidos foram de acordo com o esperado, embora dentro de cada sub-grupo pode-se também detectar os acessos mais similares entre si, o que serão de grande valia na escolha dos genótipos para posterior uso em cruzamentos.

De acordo com Röder et al. (1998) e Varshney et al. (2005), marcadores microssatélites apresentam um maior nível de polimorfismo e por serem multialélicos são altamente informativos, podendo ser usados em estudos de evolução e similaridade/diversidade genética. Além do mencionado, os marcadores moleculares exibem neutralidade fenotípica, geralmente são herdados co-dominantemente, como é o caso dos microssatélites e raramente exibem interações epistáticas ou pleiotrópicas, podendo ser detectados tanto em tecidos jovens como em adultos (Brammer, 2000).

Dentre os diferentes estudos com microssatélites em trigo, inúmeros trabalhos são realizados para estimar a similaridade/diversidade genética, seja exclusivamente em *T. aestivum*, como nas demais espécies, analisadas individualmente ou em conjunto (Ahmad, 2002; Huang, et al., 2002; Bandopadhyay et al., 2004; Song et al., 2005; Akhunov, et al., 2005; Liu et al., 2007).

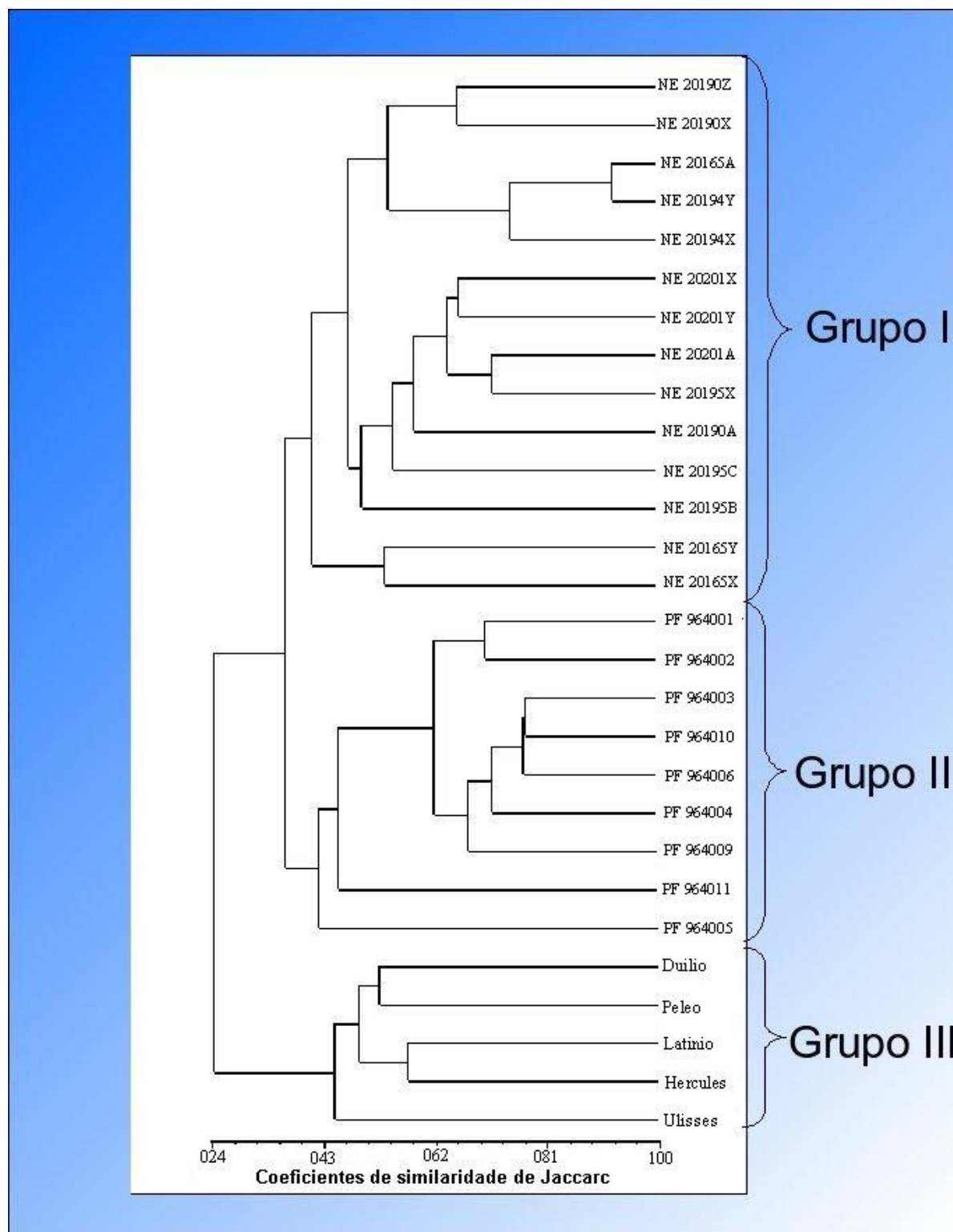


Fig. 1. Dendrograma baseado nos coeficientes de similaridade de Jaccard entre 14 acessos de *Ae. tauschii*, cinco de *T. durum* e nove híbridos, construído por análise de agrupamento (UPGMA) com base nos dados de microsatélite.

Conclusões

- O emprego de marcadores microsatélites foi eficiente para estimar a similaridade genética entre os acessos analisados;

- As informações obtidas servem como subsídio na escolha dos acessos para realização de futuros cruzamentos em programas de melhoramento genético de trigo, que buscam ampliar a variabilidade genética.

Referências bibliográficas

- AHMAD, M. Assessment of genomic diversity among wheat genotypes as determined by simple sequence repeats. **Genome**, v. 45, p. 646–651, 2002.
- AKHUNOV, E. D.; AKHUNOVA, A. R.; DVORÁK, J. BAC libraries of *Triticum urartu*, *Aegilops speltoides* and *Ae. tauschii*, the diploid ancestors of polyploid wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 111, p. 1617-1622, 2005.
- BANDOPADHYAY, R.; SHARMA, S.; RUSTGI, S.; SINGH, R.; KUMAR, A.; BALYAN, H. S.; GUPTA, P. K. DNA polymorphism among 18 species of *Triticum–Aegilops* complex using wheat EST–SSRs. **Plant Science**, v. 166, p. 349–356, 2004.
- BERED, F. Variabilidade genética: ponto de partida para o melhoramento de plantas. In: SACCHET, A. M. O. F. **Genética, para que te quero?** Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1999. p. 99-104.
- BONATO, A. L. V. **Extração de DNA genômico de cereais de inverno na Embrapa Trigo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008. 11. p. html. (Embrapa Trigo. Comunicado técnico online, 235). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co235.htm>.
- BONOW, S. **Coleções nucleares em bancos de germoplasma: conceito e utilização atual em trigo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007. 7 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos online, 80). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do80.htm>.
- BRAMMER, S. P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 7 p.html. (Embrapa Trigo. Documentos online, 3). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do03.htm>.
- BRAMMER, S. P. **Variabilidade e diversidade genética vegetal**: requisito fundamental em um programa de melhoramento. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. 9 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos online, 29). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do29.htm>.
- GUPTA, P. K.; MIR, R. R.; A. MOHAN, A.; KUMAR, J. Wheat genomics: present status and future prospects. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2008, p. 2-36, 2008.
- HUANG, X. Q.; BÖRNER, A.; RÖDER, M. S.; GANAL, M. W. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 105, p. 699-707, 2002.
- JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura Bull. **Society Vaudoise Scientific Nature**, v. 37, p. 547-579, 1901.
- LIU, J.; LIU, L.; HOU, N.; ZHAND, A.; LIU, C. Genetic diversity of wheat gene pool of recurrent selection assessed by microsatellite markers and morphological traits. **Euphytica**, v. 155, p. 249-258, 2007.
- PESTSOVA, E.; GANAL, M. W.; RÖDER, M. S. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. **Genome**, v. 43, p. 689-697, 2000.

RÖDER, M. S.; KORZUN, V.; WENDEHAKE, K.; PLASCHKE, J.; TIXIER, M.-H.; PHILIPPE, L.; GANAL, M. W. A microsatellite map of wheat. **Genetics**, v. 149, p. 2007-2023, 1998.

ROHLF, J. F. **NTSYS – pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**. Versão 2.0. New York: Applied Biostatistics Inc, 1998.

SOKAL, R. R.; MICHENER, C. D. A statistical method for evaluating systematic relationships. **The University of Kansas Scientific Bulletin**, v. 38, p. 1409-1438, 1958.

SONG, Q. J.; SHI, J. R.; SINGH, S.; FICKUS, E. W.; COSTA, J. M.; LEWIS, J.; GILL, B. S.; WARD, R.; CREGAN, P. B. Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110, n. 3, p. 1432-2242, 2005.

VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, v. 23, p. 48-55, 2005.

WALSH, B. Using molecular markers for detecting domestication, improvement, and adaptation genes. **Euphytica**, v. 161, p.1-17, 2008.



**Boletim de Pesquisa e
Desenvolvimento Online, 57**

Embrapa Trigo
Caixa Postal, 451, CEP 99001-970
Passo Fundo, RS
Fone: (54) 3316 5800
Fax: (54) 3316 5802
E-mail: sac@cnpt.embrapa.br

Expediente

Comitê de Publicações
Presidente: **Leandro Vargas**
Ana Lúcia V. Bonato, José A. Portella, Leila M.
Costamilan, Márcia S. Chaves, Paulo Roberto V. da S.
Pereira

Referências bibliográficas: Maria Regina Martins
Editoração eletrônica: Márcia Barrocas Moreira Pimentel

BRAMMER, S. P.; BONATO, A. L. V.; RIZOTTO, F. R. **Similaridade genética em acessos de *Aegilops tauschii*, *Triticum durum* e híbridos interespecíficos**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008. 13 p. html (Embrapa Trigo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Online, 57). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/bp/p_bp57.htm>.